نشریهٔ مهندسی عمران فردوسی   DOI: 10.22067/jfcei.2021.61749.0   سال سی و سوم، شمارهٔ چهار، ۱۳۹۹

بررسی قابلیت باکتری Sporsarcina Pasteuri در بهسازی و بهپالایی خاک‌های آلوده هیدروکربنی*

مقاله پژوهشی

محمدتقی بلوری بزاز[۱]   جعفر بلوری بزاز[۲]   سید محسن کرابی[۳]

چکیده در قرن حاضر استفاده از فرآورده های مختلف نفت و سوخت های فسیلی به عنوان جزء غیرقابل تفکیک از صنعت و پیشرفت‌های بشری بوده است. آنچه امروز به عنوان یک دغدغه مهم در کنار استفاده از این فرآورده‌ها مطرح است، انتشار غیرقابل کنترل آنها در قسمت‌های مختلف مانند استحصال، فرآوری، انتقال و استفاده است. سایر مشکلات استفاده از این فراورده ها، آلودگی‌های زیست محیطی و بوجود آوردن خاک‌های مسئله دار آلوده در حوزه مهندسی ژئوتکنیک است. راه کارهای زیادی برای حل جداگانه این مشکلات بررسی و ارائه شده است؛ در پژوهش حاضر استفاده از روش بهسازی میکروبی MICP(Microbiologically induced calcium carbonate precipitation) به عنوان راه حلی برای بهپالایی خاک‌های آلوده و بهبود ظرفیت باربری کاهش یافته آن با دو فرآورده نفتی گازوئیل و روغن موتور ارائه شده است. باکتری مورد استفاده در این فرآیند Sporsarcina pasteuri بوده که بصورت فلوکه (flocculate) باکتری به خاک آلوده اضافه شده و سپس طی دو مرحله ارزیابی بهپالایی (با استفاده از نتایج کروماتوگرافی) و بهسازی ژئوتکنیکی (با استفاده از نتایج آزمون برش مستقیم و نفوذپذیری) انجام شد. با کمک آنالیز FTIR(Fourier-transform infrared spectroscopy) و بررسی نمودارهای کروماتوگرافی، کاهش پیک های اجزای شناسایی شده در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه استاندارد تهیه شده از گازوئیل یا روغن موتور ملاحظه شدند. از طرفی بهبود خواص ژئوتکنیکی خاک‌های آلوده از مهمترین اثرات ملاحظه شده در نمونه‌های تیمار شده بود.

واژه های کلیدی آلودگی زیست محیطی، بهسازی، بهپالایی، *Sporsarcina pasteuri*، کروماتوگرافی و FTIR.

An Investigation into the Capability of Sporsarcina Pasteuri on Improvement and Refinement of Contaminated Hydrocarbon Soils

M. T. Bolouri Bazaz   J. Bolouri Bazaz   S. M. Karrabi

Abstract

In the present century, the use of various petroleum products and fossil fuels has been an integral part of industry and human progress. Nowadays the major concern, in addition to the use of petroleum products, is their uncontrolled diffusion in various parts such as extraction, processing, transfer and use. The other problem with the utilization of these products has arisen in the field of geotechnical engineering includes environmental pollution and the creation of problematic contaminated soils. Many solutions to these problems have been investigated and presented separately. In the present study, the *microbiologically induced calcium carbonate precipitation* (MICP) method, as a solution to purify contaminated soils and to improve its reduced bearing capacity with two petroleum products, diesel and engine oil, has been proposed. The bacterium used in this process was Sporsarcina pasteuri, which was added to the contaminated soil as a flocculate bacterium. In two stages; purification evaluation (using chromatographic results) and geotechnical improvement (using direct shear and permeability test results) were performed. With the aid of FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) analysis and chromatographic diagrams, a reduction of peaks of the identified components in the treated sample in comparison to the standard sample (prepared from diesel or engine oil) was observed. On the other hand, improving the geotechnical properties of contaminated soils was one of the most important effects observed in the treated samples.

Key Words Environmental pollution, Improvement, Refinement, Sporsarcina pasteuri, Chromatography and FTIR.

---

*تاریخ دریافت مقاله۹۹/۷/۷ و تاریخ پذیرش آن۰۰/۱/٦ می‌باشد.

(۱) دانشجوی دوره دکتری ژئوتکنیک، گروه عمران، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(۲) نویسندمسئول، دانشیار، گروه عمران، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.   **Email**: bolouri@um.ac.ir

(۳) استادیار، گروه عمران، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.

مقدمه

وابستگی شدید اقتصادهای مدرن به سوخت‌های فسیلی باعث افزایش فراوانی انتشار تصادفی هیدروکربن‌های نفتی ترکیبی از ترکیبات آلکانها، هیدروکربن‌های آروماتیک و ترکیبات حاوی نیتروژن، اکسیژن و گوگرد شده است [1,2]. کلیه فعالیت‌های صنایع نفتی از جمله اکتشاف ، استخراج ، حمل و نقل ، پالایش و مدیریت پسماندهای روغنی ، منابع احتمالی آلودگی محیط زیست هستند [7]. بطور کلی مقابله با این انتشارهای تصادفی به لحاظ اقتصادی و محیط زیستی هزینه بر است [3]. روش‌های مختلفی برای بهپالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی نظیر روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی وجود دارد. در این بین، روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمولا در مساحت‌های کم، خاک‌های درشت‌دانه و با هزینه بالا انجام پذیرند [6]. استفاده از روش‌های بهپالایی زیستی هیدروکربن‌های نفتی یک فناوری موثر، اقتصادی و سازگار با محیط زیست است که امروزه به عنوان یک راهکار عملی برای بهبود خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی محسوب می‌شود [4,5]. ترکیبات هیدروکربنی به لحاظ تجزیه بدلیل محلول ناپذیریشان در آب بسیار سرسختند [8]. از طرفی متابولیزم میکروارگانیزهای سازگار با این مواد آن‌ها را به مواد ساده‌تری تجزیه می‌کنند؛ به جای زبان دیگر از حالتی غیرفعال به ملکول‌هایی فعال تر برای تجزیه تبدیل می‌کند [9].

مشکلات ژئوتکنیکی ناشی از انتشار مواد هیدروکربنی در کنار تاثیرات منفی این مواد بر پارامترهای مقاومتی خاک‌های آلوده قابل توجه است [10]. بهسازی با استفاده از روش‌های شیمیایی مانند استفاده از سیمان [15,16,21]، آهک [19,20]، روباره خاکستر [17] و یا روباره کوره سیمان [18] است. همچنین روش‌های بهسازی با استفاده نانوذرات (نانوذرات آهن [11] یا نانوذرات رس [12]) روشی مناسب برای بهسازی خاک‌های آلوده است. بهسازی به روش زیستی یا بیو مانند، مانند روش MICP به عنوان یکی از سازگارترین، جدیدترین و مناسبترین روش‌ها برای بهسازی است که با استفاده از پتانسیل‌های موجود بین ذرات خاک و باکتری مناسب، می‌توان از آن بهره برد. استفاده از روش ترسیب میکروبی کلسیم کربنات برای بسیاری از موارد و کاربردهای مهندسی مانند بهسازی مورد استفاده قرار گرفته است [13,14]. فرآیندهای ژئوشیمیایی زیستی می‌توانند خصوصیات فیزیکی (تراکم، دانه بندی، تخلخل، درجه اشباع)، هدایتی (هیدرولیک ، الکتریکی ، حرارتی)، مکانیکی (سختی، اتساع، تراکم پذیری، تورم یا اتساع، انسجام، زاویه اصطکاک، فرسایش پذیری) و شیمیایی (واکنش پذیری و ظرفیت تبادل کاتیون) خاک‌ها را تغییر و بهبود دهند [15]. روش بهسازی رسوب میکروبی کلسیم کربنات، روشی است از مهندسی بیوژئوتکنیک که در نتیجه فعالیت متابولیک میکروبی انجام می‌پذیرد [23,24]. رسوب کلسیم با استفاده از روش‌های مختلفی امکان پذیر است که کارامدترین آن استفاده از هیدرولیز آنزیمی اوره توسط باکتری است [25]. Bacillus pasteurii، که اخیرا با عنوان Sporosarcina pasteurii (ATCC 11859) مجددا طبقه بندی شده است، یک باکتری قلیادوست با آنزیم اوره‌آز بسیار فعال است [26]، در مطالعات آزمایشگاهی جهت ترسیب کلسیم مورد استفاده قرار گرفته است [27].

از طرفی در مورد پژوهش های انجام شده در حوزه بهپالایی میتوان به تحقیقات سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا در مورد بهپالایی خاک های آلوده به انواع هیدروکربن ها به روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی اشاره کرد [36,39]. در مورد روش های شیمیایی تحقیقات زیادی مبنی بر استفاده از مواد شیمیایی مانند سورفاکتانت ها انجام شده است [37]. همچنین، استفاده از روش های زیستی مانند کنسرسیوم باکتری های برای تجزیه مواد هیدروکربنی به مواد ساده تر نیز انجام پذیرفته است [38].

آنچه در میان تحقیقات حاضر دارای خلل است، ارائه راهکاری مناسب برای بهسازی و بهپالایی خاک‌های آلوده هیدروکربنی به صورت همزمان و به گونه‌ای است که بتواند ضمن تجزیه و ساده سازی اجزای هیدروکربن، خواص مکانیکی از دست رفته آن را بازیابی نموده و به نحوی با کاهش نفوذپذیری خاک از گسترش بیشتر حرکت آلاینده در خاک ممانعت به عمل آورد. به عنوان نمونه، Abduolrahimi, S. و Kang, C. H. and et al. با استفاده از گونه باکتری Sporosarcina pasteurii نسبت به بهپالایی زیستی کادمیم با روش رسوبگذاری زیستی کربنات کلسیم در خاک شنی پرداختند [28,29].

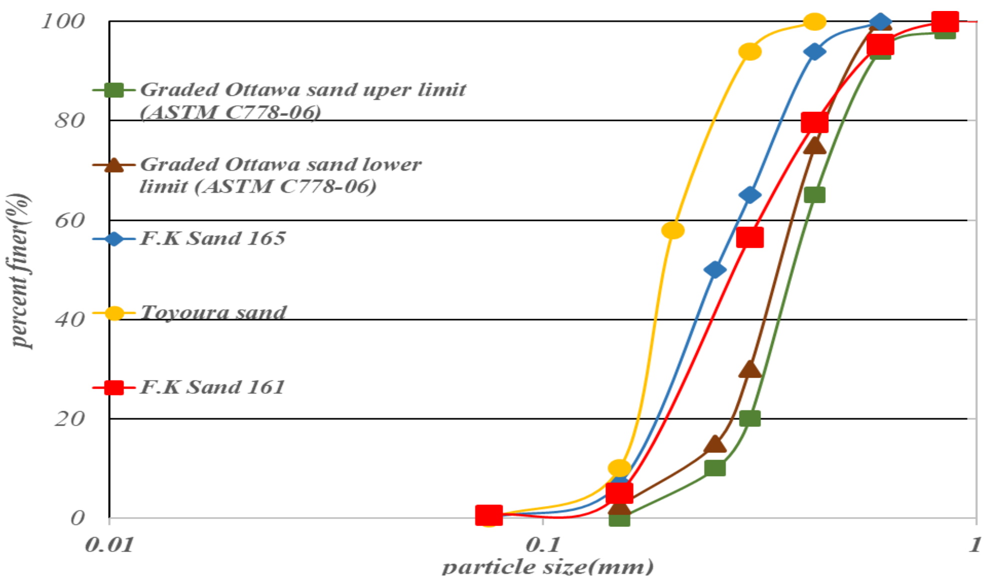
پژوهش حاضر بررسی فرآیند بهسازی و بهپالایی را به صورت همزمان و با استفاده از تحلیل نتایج آزمون‌های کروماتوگرافی جرمی و گازی نمونه های تیمار شده و تیمار نشده و همچنین نتایج آزمون های مکانیک خاک کلاسیک به سرانجام می‌رساند.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش، خاک دانه‌ای، دو نوع آلاینده هیدروکربنی رایج (روغن موتور و گازوئیل) و نیز سویه باکتری Sporsarcina pasteuri بوده است.

خاک

خاک مورد استفاده در پژوهش حاضر ماسه ۱۶۱ فیروزکوه ایران بود که نحوه توزیع دانه‌بندی آن در شکل (۱) نشان داده شده است (ASTM D422). رده‌بندی این *ماسه، بد دانه‌بندی شده* یا SP [19] می‌باشد. مشخصات فیزیکی این ماسه در جدول (۱) آمده است.



شکل ۱ نمودار دانه بندی ماسه فیروزکوه ۱۶۱ در مقایسه با ماسه های استاندارد معمول در پژوهش ها

جدول ۱ مشخصات فیزیکی ماسه فیروزکوه

Gs	e_{max}	e_{min}	D_{10} (mm)	D_{60} (mm)	Cc	Cu
2.658	0.94	0.60	0.167	0.40	1.01	2.39

جدول ۲ مشخصات آلاینده ها

نام مایع	گرانروی سینماتیک (mm^2/s) [ASTM D 2270:2004]		نقطه اشتعال (درجه سلسیوس)	
	دمای ٤٠ درجه سلسیوس	دمای ١٠٠ درجه سلسیوس	باز [ASTM D1310]	بسته [ASTM D 92-05a]
روغن موتور	165.23	17.82	۲۱۷	–
گازوئیل	3.05	-	–	۷۵

آلاینده

برای آلوده نمودن نمونه‌های مورد آزمایش، از دو نوع آلاینده هیدروکربنی شامل گازوئیل و روغن موتور استفاده شده است که مشخصات آن در جدول (۲) زیر آمده است.

کشت و رشد سویه باکتری و نحوه ورود به خاک جهت بهسازی

سویه اصلی باکتری Sporsarcina ATCC11859 pasteuri می‌باشد که دارای اوره‌آزی بالایی بوده و از بانک میکروارگانیزم ایران تهیه شد. جهت کشت و آماده سازی سوسپانسیون باکتری و با استناد به تحقیقات بلوری بزاز و همکاران [32] پس از تهیه محیط کشت جامد Nutrient Agar و اتوکلاو نمودن آن به مدت ۱۵ دقیقه و اضافه کردن اوره ۲۰٪ و کشت باکتری، محیط کشت مایع (۲۰ گرم عصاره مخمر (Yeast Extract)، ۱۷ مولار کلرید آمونیوم (NH_4Cl_2)، ۰/۱ میلی مولار کلرید نیکل ($NiCL_2$) و ۲۰ گرم اوره ($CO(NH_2)_2$) در یک لیتر آب مقطر) تهیه و اسیدیته آن به ۹/۲۵ رسید؛ با قراردادن محیط کشت در شیکر انکوباتور، جمعیت باکتری با اسپکتوفوتومتر کنترل و سوسپانسیون هنگامی که دانسیته نوری در طول موج ٦۰۰ نانومتر به ۲/۲۵ رسید، آماده استفاده شد. برای تهیه فلوکه باکتری، مقدار ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلرید در یک لیتر محیط کشت حاوی باکتری اضافه شد. کلسیم کلرید باعث تجمع و انعقاد سلول‌های باکتری شده و در نهایت باعث رسوب باکتری‌ها در ته ظرف می‌گردد. پس از ته‌نشست فلوکه باکتری، ۸۵٪ سوپرناتانت رویی حذف گردید [30]؛ بدین ترتیب، سوسپانسیون باکتری به همراه $CaCl_2$، به صورت لخته و فلوکه شده آماده ورود به خاک شد. اختلاط کلسیم کلرید و سوسپانسیون باکتری سبب شکافت پوسته باکتری و آزادسازی آنزیم‌های اوره‌آز آن می‌شود. ورود محلول فلوکه باکتری به صورت خیساندن با خاک مورد آزمایش بوده و هم حجم آن، محلول سیمانتاسیون (حاوی یک مولار کلسیم کلرید و اوره در یک لیتر آب مقطر استریل [31]) به خاک وارد شد.

دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) و آشکارساز

از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Chrompack CP9001 ساخت کشور هلند مجهز به سیستم تزریق Split/Splitless مورد استفاده در حالت انشعابی و آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) برای جداسازی و اندازه‌گیری کمی گونه‌ها استفاده شد (شکل ۲). ستون تجزیه‌ای مورد استفاده، یک ستون موئینه سیلیکای ذوب‌شده نیمه قطبی (CP-Sil 24CB) ساخت شرکت Chrompack کشور هلند متشکل آنالیز از ۵۰ درصد فنیل سیلوکسان و ۵۰ درصد دی متیل سیلوکسان (Column Description: CP-Sil 24 CB 50% Diphenyl / 50% Dimethylpolysiloxan) و به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. از هلیوم با خلوص بالا (۹۹/۹۹۹ ٪ شرکت سبلان، ایران) با سرعت جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه و نسبت انشعابی ٤۸:۱ به عنوان گاز حامل استفاده شد. شرایط دستگاه GC به صورت زیر بود:

دمای منطقه تزریق ℃ ۲۹۰، دمای اولیه گرمخانه

۵۰ °C تنظیم شد که به مدت ۲ دقیقه در این دما باقی ماند، سپس با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای نهایی ۲۹۰ °C رسید و ۵ دقیقه در این دما باقی ماند. کل زمان انجام یک برنامه ۳۱ دقیقه بود. دمای آشکارساز ۲۵۰ °C تنظیم شده بود، سرعت جریان هوا ۲۵۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و سرعت جریان هیدروژن ۳۰ میلی‌لیتر بر دقیقه بود.



شکل ۲ دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده در پژوهش

آلوده سازی و استخراج آلاینده

آلوده سازی نمونه‌ها به روش خیساندن و با ٦٪ وزنی انجام شد. همچنین جهت ارزیابی وضعیت و تغییرات ایجاد شده در آلاینده‌ها، آلاینده باید از خاکی که با آن مخلوط شده بود خارج شده و مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

ساخت نمونه استاندارد از آلاینده‌ها

نمونه استاندارد گازوئیل و روغن موتور (بصورت جداگانه) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در حلال دی کلرومتان تهیه شد. از این نمونه برای شناسایی اجزای موجود در گازوئیل و روغن موتور استفاده گردید.

برنامه آزمون‌ها

آزمون های انجام شده در تحقیق حاضر بر پایه ارزیابی سه موضوع مورد بحث در عنوان پژوهش است:

۱. ارزیابی میزان بهسازی (استفاده از نتایج آزمون برش مستقیم و نفوذپذیری جهت ارزیابی میزان بهبود پارامترهای مقاومت برشی خاک)
۲. ارزیابی میزان بهپالایی (استفاده از نتایج کروماتوگرافی که در آزمایشگاه‌ها برای جداسازی ترکیبات استفاده می‌شود)
۳. ارزیابی نحوه ترسیب و میزان رسوب کلسیم کربنات (استفاده از تحلیل نتایج FTIR (ASTM D7889) و شیمی تر [33])

جهت تعیین پارامترهای مقاومتی خاک طبیعی، آلوده شده و نیز نمونه بهسازی شده از آزمون برش مستقیم (ASTM-D2166) استفاده شد. در مورد خاک‌های آلوده بهسازی شده یا نمونه شاهد برای تیمار به کمک بهسازی میکروبی، نمونه‌ها با ٦٪ از مایع منفذی (آب یا آلاینده) داخل ظرفی به ابعاد ۲۵×۱۵×٤ سانتیمتر با وزن مخصوص ۱٦/۹ kN/m³ مورد نظر ریخته شدند. قالب مربوط به آزمون برش مستقیم با ابعاد ۱۰×۱۰×۲/۵ سانتیمتر نیز به صورت مدفون و در میانه ظرف قرار گرفت. با اتمام فرآیند بهسازی، نمونه داخل قالب به قالب اصلی آزمون برش منتقل شد. نمونه‌های آماده شده در قالب ۱۰×۱۰ سانتیمتر را قبل از ورود به قالب اصلی برش نمایش می‌دهد. آزمون برش مستقیم در تنش‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع و با سرعت حرکت ۱ میلیمتر بر دقیقه تنظیم و انجام شد. با همین وزن مخصوص، آزمون نفوذپذیری صورت پذیرفت. از مرکز نمونه‌های برش خورده از آزمون برش مستقیم، نمونه‌هایی برای تعیین میزان CaO و همچنین آنالیز FTIR انتخاب شد. مشابه فرآیند تولید نمونه برای آزمون برش مستقیم، در داخل قالب مربوط به آزمون نفوذپذیری، فرآیند بهسازی انجام و نتایج آن گزارش شد.

بنابراین برنامه آزمون های ارزیابی میزان بهسازی به شرح جدول (۳) انجام شد:

جدول ۳ کد گذاری نمونه های مورد آزمایش در برش مستقیم

نوع آلاینده	بهسازی نشده	بهسازی با اختلاط فلوکه
گازوئیل	GN	GF
روغن موتور	MN	MF
آب	WN	WF

روش کروماتوگرافی عمومی‌ترین، قدرتمندترین و انعطاف پذیرین روش جداسازی در دسترس است. این روش می‌تواند برای جداسازی گستره دسته وسیعی از ترکیبات بکار رود. از این رو می‌توان برای جدا کردن مولکول‌ها و ترکیبات هیدروژن‌دار، بنزنی، ایزومرها، داروها و مشتقات آمینو اسید استفاده کرد. کروماتوگرافی گازی (GC) یک نوع معمول از کروماتوگرافی است که در شیمی تجزیه برای جداسازی و تجزیه ترکیبات فرار بدون تخریب آنها استفاده می‌شود. در کروماتوگرافی گازی وجود یک آشکارساز آنلاین برای نمایش خروجی اجزای نمونه تجزیه شده لازم است. آشکارساز در واقع یک سنسور ترکیبات است که تغییرات در ترکیب خروجی ستون را به ولتاژ یا جریان تبدیل می‌کند که باید اندازه‌گیری و ثبت شود. در این پژوهش برای تحلیل نمونه های مورد آزمایش، از دو آشکارساز استفاده شده است. آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) یک ابزار عملی و پرکاربرد برای اندازه‌گیری آنالیت‌ها در جریان گاز است که غالبا به عنوان یک آشکارساز در کروماتوگرافی گازی استفاده می‌شود. همچنین آشکارساز طیف‌سنج جرمی قدرتمندترین آشکارساز کروماتوگرافی گازی است. در سیستم GC/MS طیف سنج جرمی به صورت مداوم جرم‌ها را در سراسر جداسازی اسکن می‌کند. هنگامی که نمونه از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شود از خط انتقال گذشته و به ورودی طیف‌سنج جرمی منتقل می‌شود. باید دقت داشت که برای اندازه‌گیری کمی لازم است ابتدا مقداری از گونه استاندارد با غلظت مشخص به دستگاه تزریق شود و سپس با توجه با این نمونه استاندارد گونه مورد نظر شناسایی شود. به همین منظور، نمونه های استخراج شده از خاک‌های آزمون برش و همچنین نمونه خالص آلاینده برای ارزیابی به دستگاه تزریق و آشکارسازی ها انجام پذیرفتند [35] و مقایسه جهت تحلیل پیک‌های حذف شده صورت پذیرفت. با توجه به توضیحات فوق، کدگذاری آزمون‌های کروماتوگرافی گازی به شرح جدول (٤) انجام شد:

جدول ٤ کد گذاری نمونه های مورد آزمایش در کروماتوگرافی گازی

عنوان نمونه	کد گذاری
نمونه استاندارد روغن موتور	m_{100}
نمونه استاندارد گازوئیل	g_{100}
نمونه استخراجی از خاک آلوده به روغن موتور	W_m
نمونه استخراجی از خاک آلوده به گازوئیل	W_g
نمونه استخراجی از خاک آلوده به روغن موتور پس از بهسازی میکروبی	m
نمونه استخراجی از خاک آلوده به گازوئیل پس از بهسازی میکروبی	g

بحث و تحلیل نتایج

نتایج آزمون های مکانیک خاک کلاسیک و شیمی تر

نتایج آزمون های مکانیک خاک کلاسیک به همران درصد جرمی تولید شده CaO در جدول (۵) مشخص شده است:

جدول ۵ خلاصه نتایج آزمون های مکانیک خاک کلاسیک

CaO (%)	Permeability (cm/s)*10^{-3}	C (kPa)	φ(°)	Sample Code
0.05%	5.03	0	38	WN
9.7%	1.35	630	52	WF
0.05%	4.01	17	17	MN
3.3%	3.99	33	19	MF
0.05%	4.31	10	24	GN
4.5%	1.95	20	28	GF

افزایش پارامترهای مقاومت برشی برای انواع خاکها، گواه تاثیر پذیر بودن فرآیند MICP بر این گونه هاست. به نحوی که در تمامی نمونه ها، رسوب کلسیم کربنات ملاحظه شده است. در این حین باید تاثیرگذاری دو موضوع بررسی شود، اول اینکه رابطه بین نوع مایع منفذی و فرآیند MICP و دوم، نحوه درگیر شدن رسوبات کلسیم کربنات در محیط‌های مختلف (به لحاظ مایع منفذی آن) با دانه های خاک است.

در واقع آنچه به عنوان متغیر بین مایع‌های منفذی وجود دارد، آلاینده بودن یک نوع در مقابل دیگری است و با توجه به اینکه فرآیند MICP رابطه مستقیمی با میزان عملکرد موجودات زنده دارد، بنابراین تفاوت نوع مایع منفذی بر عملکرد آن‌ها تاثیر گذار می‌باشد. بر همین رویه، آزمون بازدارندگی دیسکی [34] برای ارزیابی میزان بازدارندگی آلاینده‌های هیدروکربنی به شرح جدول (٦) انجام شد.

نتایج این آزمون حکایت از بازدارندگی آلاینده‌های هیدروکربنی در مقابل فعالیتهای زیستی دارد. این میزان از بازدارندگی در گازوئیل کمتر از روغن موتور بوده و بر همین مبنا حجم کمتر تولید CaO را می‌توان دریافت؛ بنابراین رابطه بین نوع مایع منفذی و فرآیند MICP مشخص شده و از طرفی باید دانست که با توجه به حجم CaO تولید شده، اثربخشی بهبود پارامترها در خاک‌های هیدروکربنی ضعیفتر از خاک معمولی است. همانطور که در شکل (۳) مشخص شده است، اطراف خاک آلوده هیدوکربنی، لایه‌های آلاینده وجود دارد که مانع از اتصال مناسب رسوبات به دانه ها شده؛ بدین ترتیب بهبود پارامترهای ژئوتکنیکی به صورت محسوس دیده نمیشود. کاهش نفوذپذیری نیز به واسطه دو عامل است، اول حضور خود آلاینده‌ها سبب کاهش نفوذپذیری خاک شده و دو اینکه رسوبات کلسیم کربنات به گونه ای بین دانه ها قرار می‌گیرند که خود سبب کاهش فضای خالی و کاهش نفوذ می‌گردد.

جدول ٦ مراحل و نتیجه آزمون بازدارندگی دیسکی

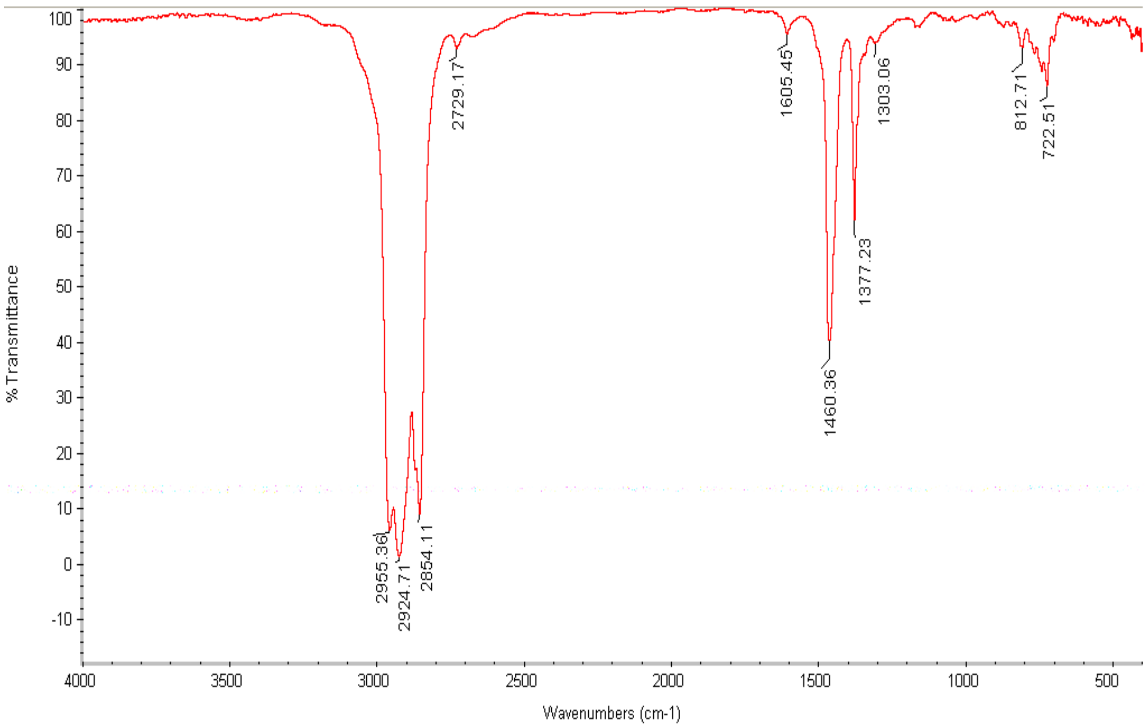
ردیف	فرآیند	توضیحات
۱	تهیه محیط کشت جامد و کشت باکتری به صورت چمنی	-
۲	تهیه گازوئیل و روغن موتور با رقت ٦٪	-
۳	آغشته کردن دیسک شاهد به آب و دیسک مورد آزمایش به هر کدام از محلول های رقیق شده به مدت ۱۵ دقیقه	پس از آغشته شدن، سه دیسک شاهد، دیسک آغشته به روغن و دیسک آغشته به گازوئیل وجود داشت.
٤	قرار دادن دیسک ها در داخل پتری کشت شده	پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت انکوبه (به منظور ثابت نگه داشتن دما) شدند.
۵	بررسی هاله های ایجاد شده اطراف دیسک ها و مقایسه با دیسک شاهد	-
٦	ایجاد هاله بازدانده اطراف دیسک آغشته به روغن موتور به اندازه ۱۲/۵ میلیمتر	-
۷	ایجاد هاله بازدانده اطراف دیسک آغشته به گازوئیل به اندازه ۱/۵ میلیمتر	-



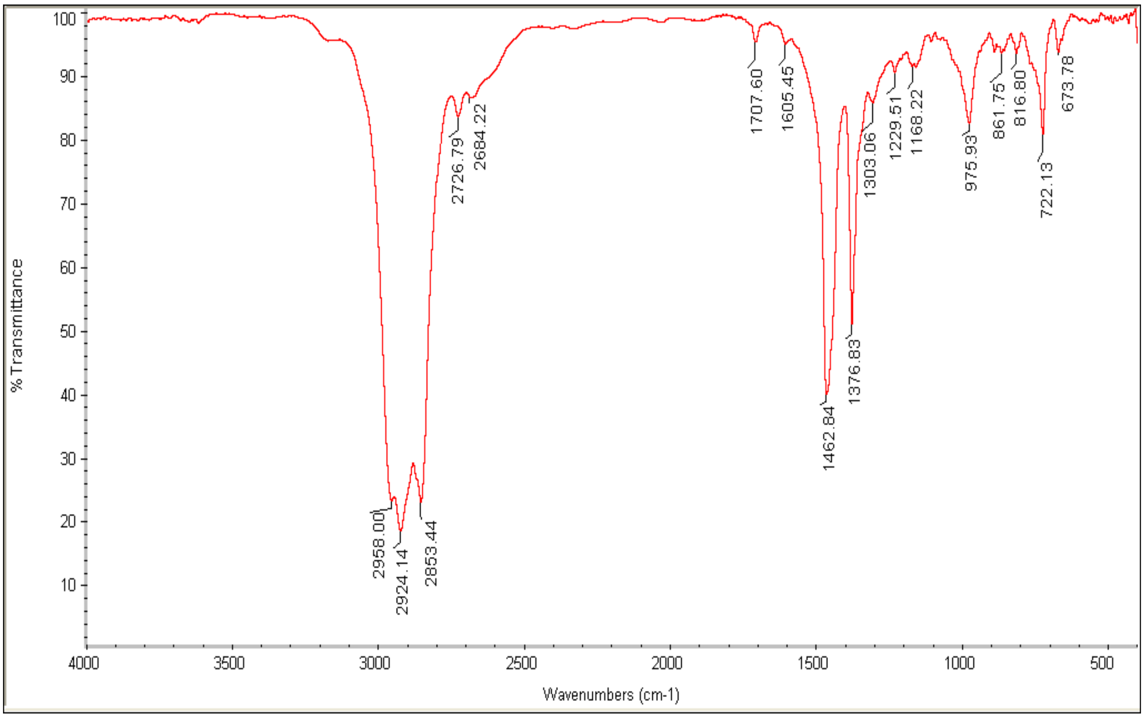
شکل ۳ شماتیک نحوه شکل گیری رسوب کلسیم کربنات بین دانه های آلوده هیدروکربنی

نتایج آنالیز FTIR

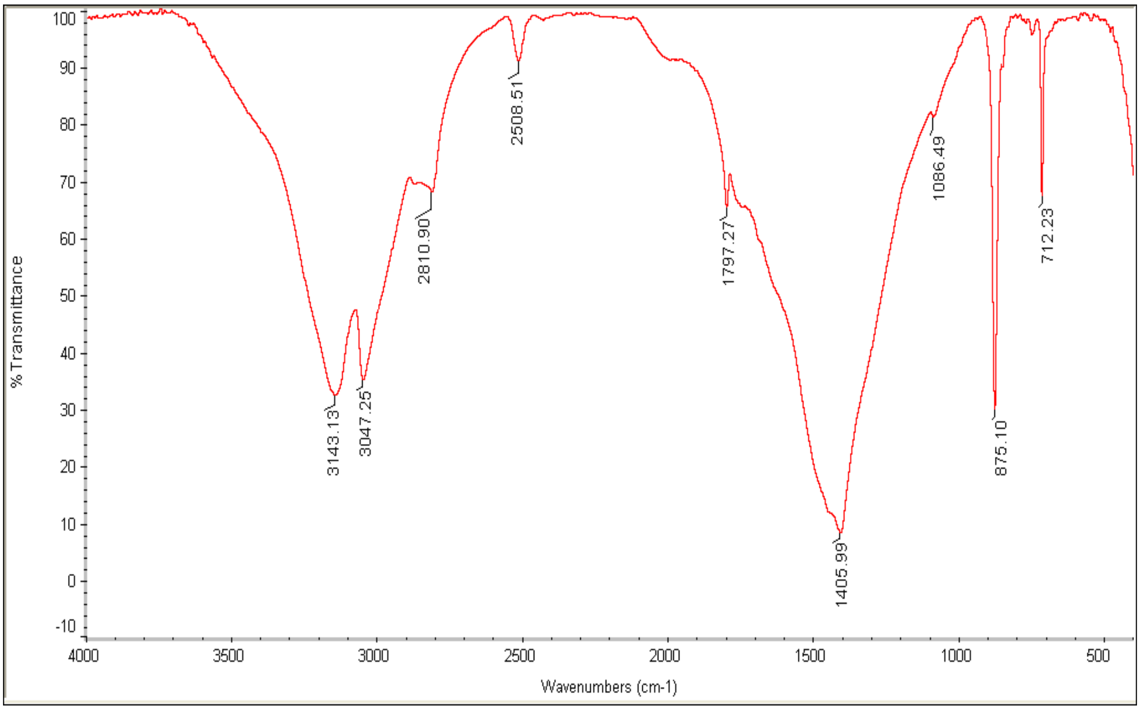
طیف سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به عنوان روشی پرقدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیائی به کار می‌رود. بر همین مبنا، تحلیل طیف سنجی مادون قرمز بر روی نمونه ها در دو قالب گرفته شد. اول نمونه‌های مربوط به آلاینده‌ها، قبل از فرآیند بهسازی (شکل‌های (٤) و (٥))؛ همچنین طیف سنجی مادون قرمز از نمونه محیط کشت نیز انجام و در شکل (٦) ارائه شد؛ تفسیر شکل‌های (٤)، (٥) و (٦) در جدول (٧) آمده است. قسمت دوم آنالیزها، بر روی نمونه های بهسازی شده از خاک‌های آلوده شده به گازوئیل و روغن موتور بود که پس از فرآیند MICP صورت پذیرفت و تفسیر شکل‌های (٧) و (٨) در جدول (٨) آمده است.



شکل ٤ طیف سنجی مادون قرمز از نمونه خاک آلوده به گازوئیلی



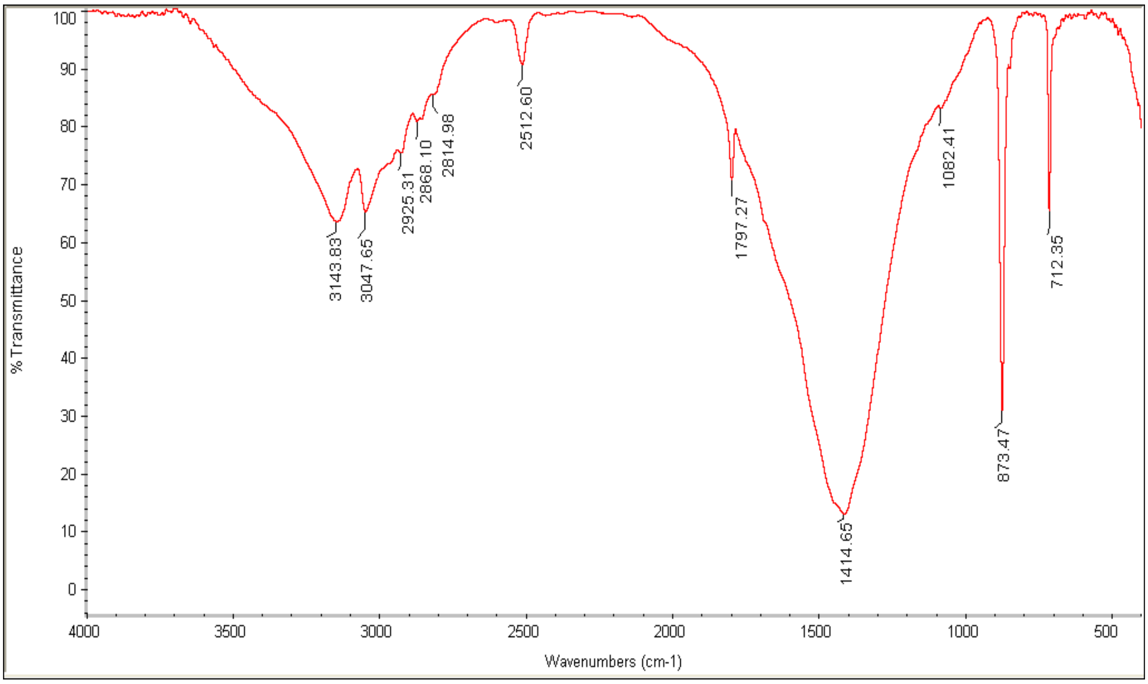
شکل ۵ طیف سنجی مادون قرمز از نمونه خاک آلوده به روغن موتور



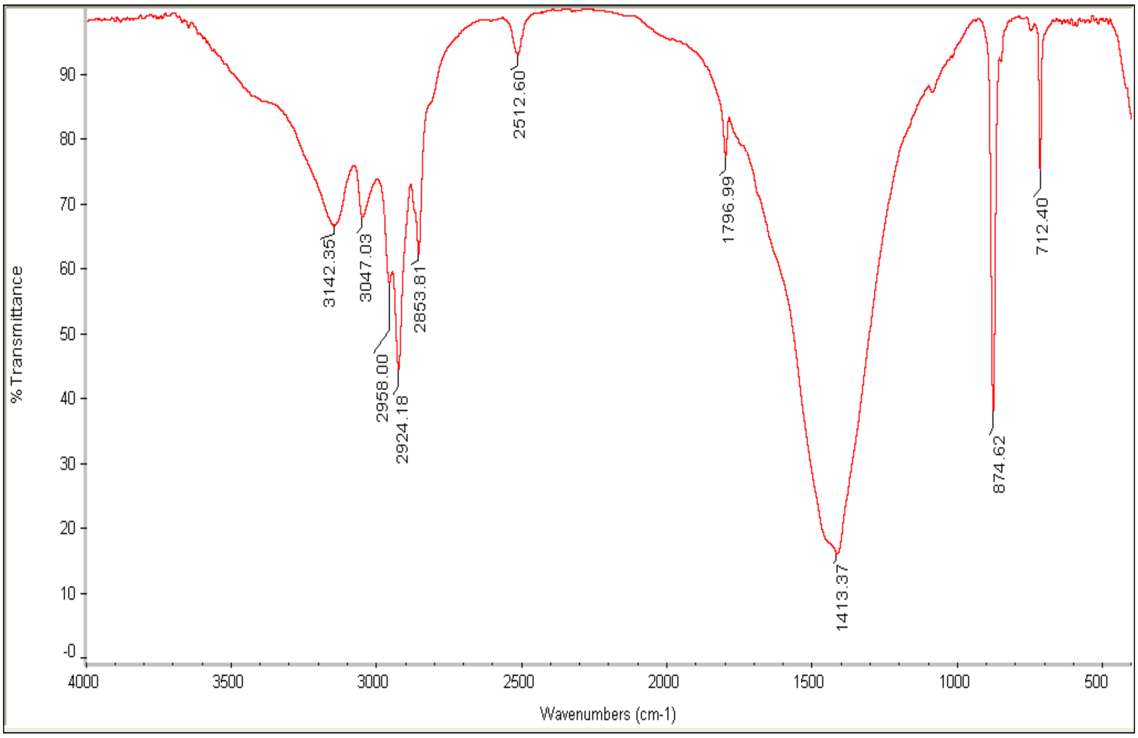
شکل ٦ طیف سنجی مادون قرمز محیط کشت Yeast Extract

جدول ۷ بررسی طیف سنجی مادون قرمز نمونه خاک‌های آلوده شده به روغن موتور و گازوئیل و همچنین محیط کشت و باکتری

نام نمونه	طول موج مورد بررسی	نوع ترکیب یا پیوند
گازوئیل	ناحیه $2955cm^{-1}$ تا $2854cm^{-1}$	ارتعاشات پیوند C-H گروه های متیل و متیلن
	$1460cm^{-1}$	ارتعاش گروه CH_2
	$1377\ cm^{-1}$	ارتعاش خمشی پیوند C-H
	باندهای $812cm^{-1}$ و $722cm^{-1}$	ترکیبات آروماتیک
روغن موتور	ناحیه $2955cm^{-1}$، $2924cm^{-1}$ و $2853cm^{-1}$	گروه C-H
	$2726cm^{-1}$ و $2684cm^{-1}$	گروه آلدهید
	پیک های $1707cm^{-1}$ و $1605cm^{-1}$	گروه سوکسین ایمید
	$1462cm^{-1}$ و $1229cm^{-1}$	پخش کننده های سوکسین ایمید
	$1168cm^{-1}$	دترجنت های سولفونات
	$975cm^{-1}$	پیوند P-O-C
	$722cm^{-1}$	اکسیدان های آمینی
محیط کشت باکتری	پیک $3143cm^{-1}$ و $3047cm^{-1}$	ارتعاش متقارن پیوند CH- حلقه کینولین آروماتیک
	$2810cm^{-1}$	ارتعاش کششی C-H آلیفاتیک
	$2508cm^{-1}$	ارتعاش متقارن C-H در گروههای متیل
	$1405cm^{-1}$	ارتعاش پیوند C-C در زنجیره C-C آلیفاتیک
	$875cm^{-1}$	ارتعاش کششی C-C



شکل ۷ طیف سنجی مادون قرمز از نمونه خاک آلوده گازوئیلی بهسازی شده با روش MICP



شکل ۸ طیف سنجی مادون قرمز از نمونه خاک آلوده شده به روغن موتور پس از بهسازی با روش MICP

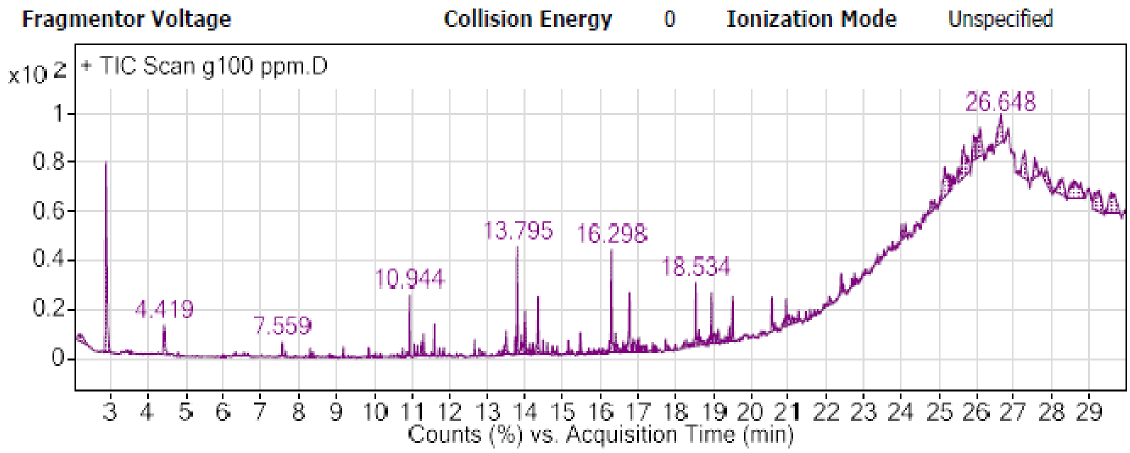
جدول ۸ مقایسه طیف سنجی مادون قرمز نمونه خاک‌های آلوده شده به روغن موتور و گازوئیل پس از بهسازی با روش MICP

تفسیر مقایسه ای	نوع پیک	منشا	رخداد
شکل ۷	پیک های $3143cm^{-1}$ و $3047cm^{-1}$	محیط کشت	کاهش شدت پیک
	پیک های $2925cm^{-1}$ و $2868cm^{-1}$	گازوئیل	حذف کامل پیک
	$812cm^{-1}$	گازوئیل	حذف کامل پیک
	$2513cm^{-1}$	تاثیر باکتری بر گازوئیل	بوجود آمدن کلسیم کربنات
شکل ۸	شدت دو پیک $3142cm^{-1}$ و $3047cm^{-1}$	محیط کشت	کاهش شدت پیک
	پیک های $2958cm^{-1}$ و $2924cm^{-1}$ و $2853cm^{-1}$	روغن موتور	کاهش شدت پیک
	$975cm^{-1}$	روغن موتور	حذف کامل پیک
	$2513cm^{-1}$	تاثیر باکتری بر روغن موتور	بوجود آمدن کلسیم کربنات

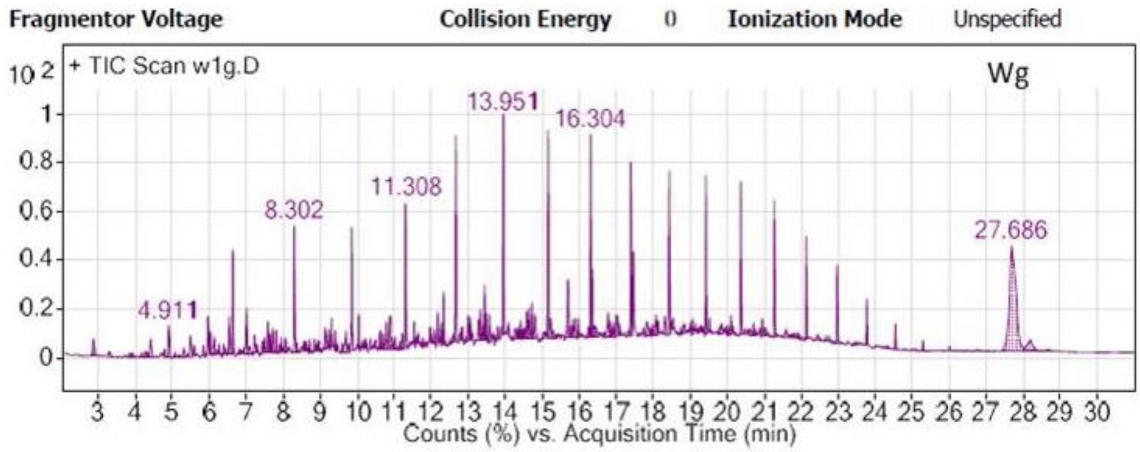
نتایج کروماتوگرافی جرمی

خلاصه نتایج کروموتوگرافی جرمی در نمونه ها به شرح زیر ارائه شده اند:

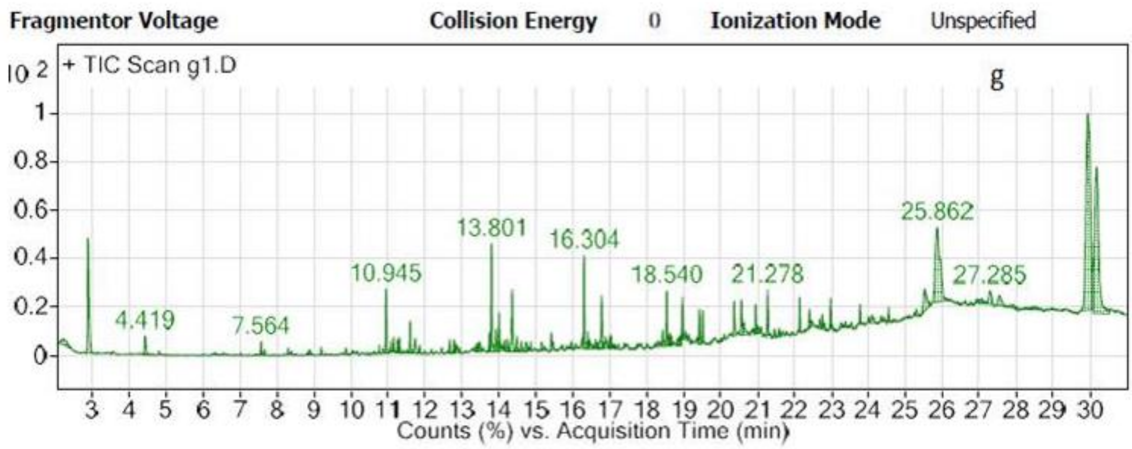
شکل های (۹)، (۱۰) و (۱۱) به ترتیب نشان دهنده کروماتوگرام جرمی نمونه های g100 ، gWg و g می باشد.



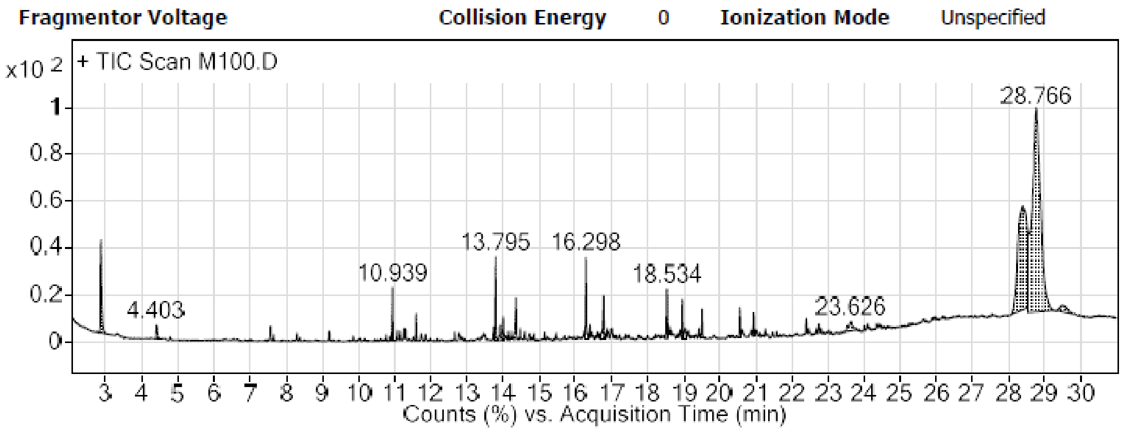
شکل ۹ کروموتوگرافی جرمی نمونه g100



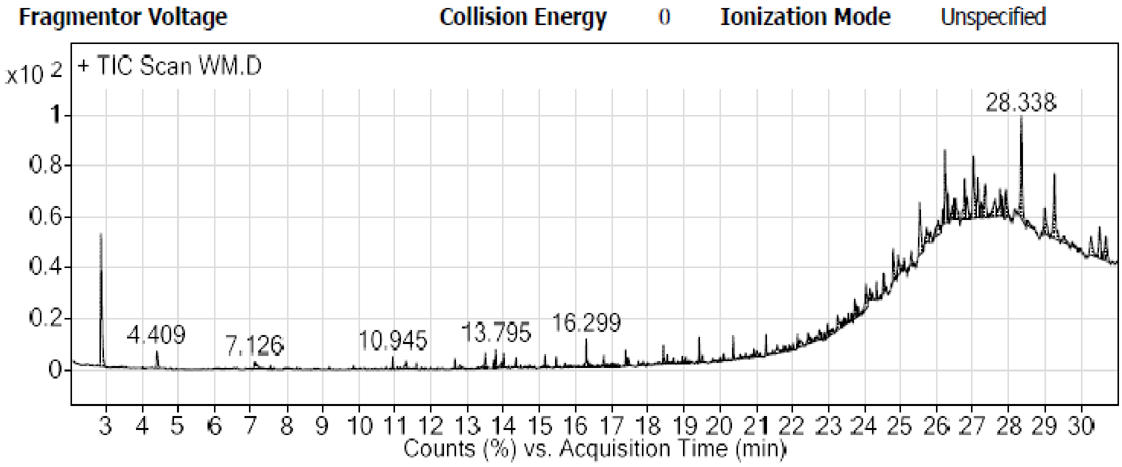
شکل ۱۰ کروموتوگرافی جرمی نمونه Wg



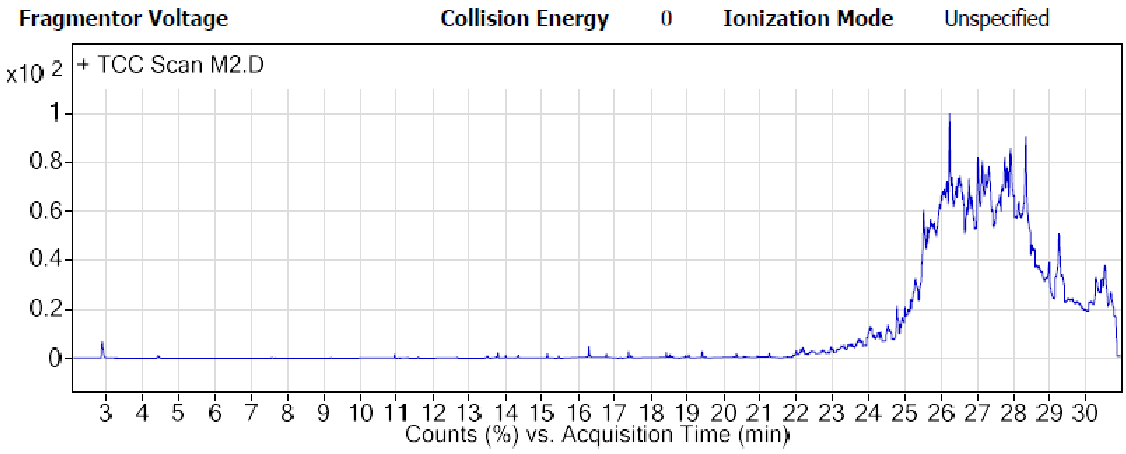
شکل ۱۱ کروموتوگرافی جرمی نمونه g



شکل ۱۲ کروموتوگرافی جرمی نمونه m100



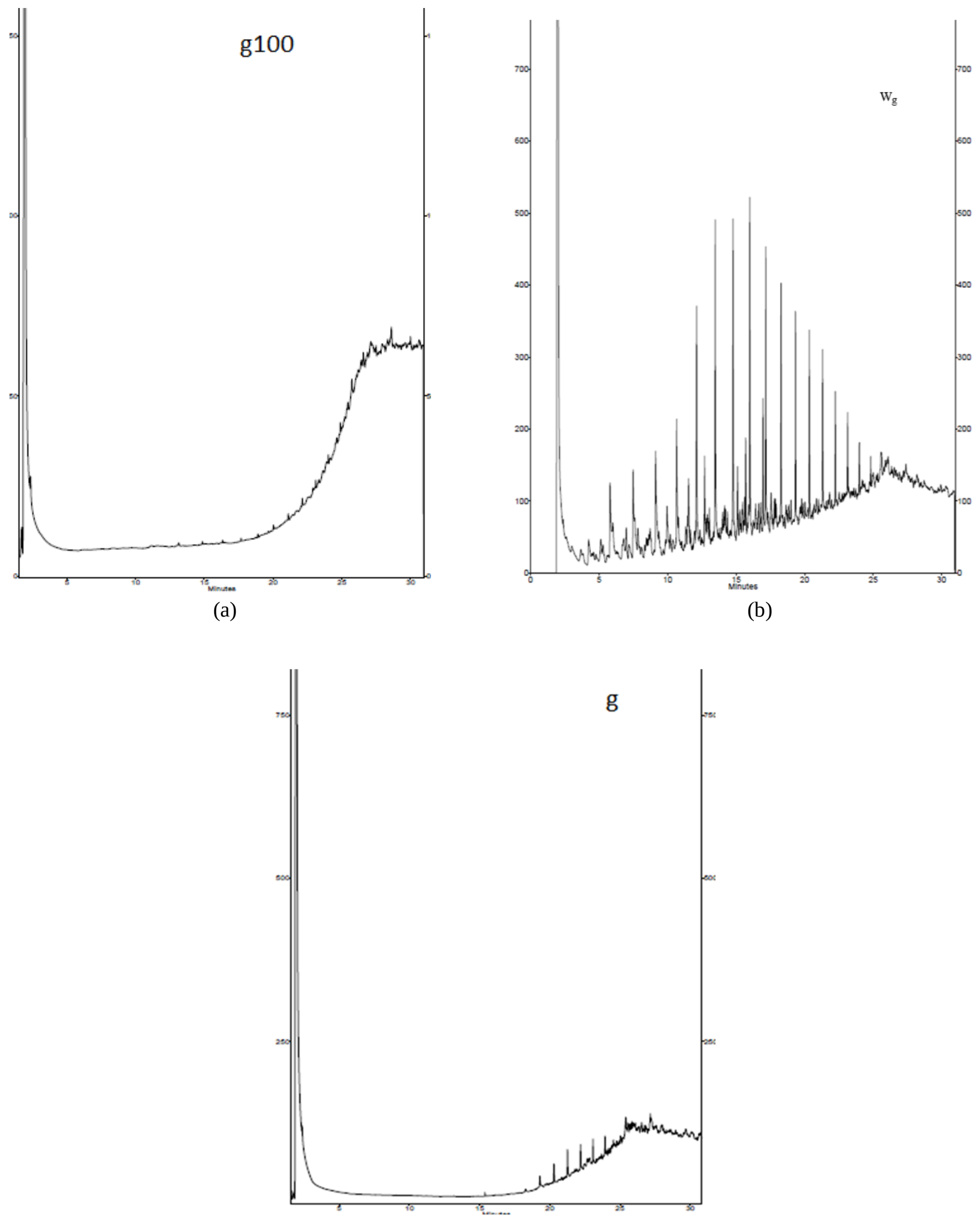
شکل ۱۳ کروموتوگرافی جرمی نمونه W_m



شکل ۱٤ کروموتوگرافی جرمی نمونه m

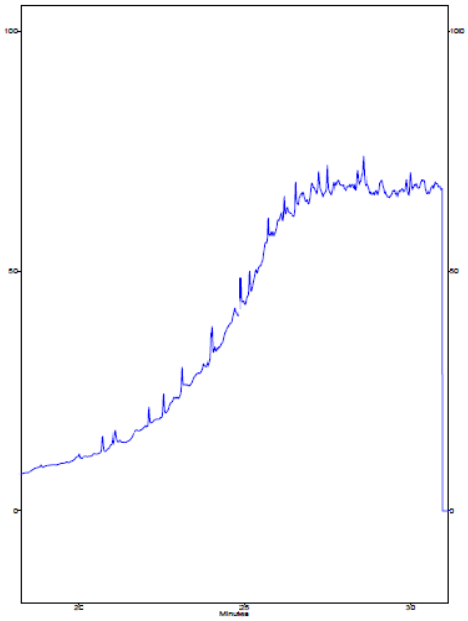
نتایج کروماتوگرافی گازی

در بررسی نتایج کروماتوگرافی گازی، لازم است نمونه‌ها تحت دستگاه کروماتوگرافی گازی قرار بگیرد. به کمک این دستگاه گونه ها از هم جدا شده، سپس توسط آشکارساز مربوطه شناسایی گونه‌ها انجام می‌شود. با آشکارساز یونش شعله‌ای می‌توان پس از جداسازی اجزا و با تزریق نمونه‌های استاندارد محل پیک گونه ها را مشخص کرد و پس از تعیین محل هر پیک، غلظت گونه ها موجود در نمونه تعیین کرد. شکل های (۱۵) و (۱٦) کروموتوگرافی گازی نمونه های گازوئیلی و روغن موتوری را نمایش می دهد.

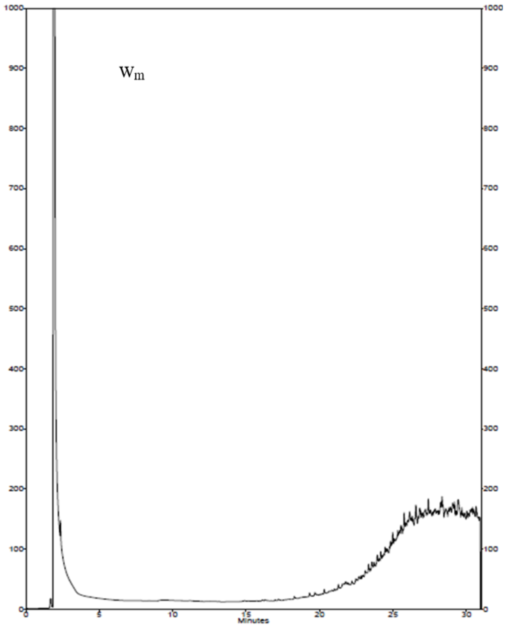


(a) (b) (c)

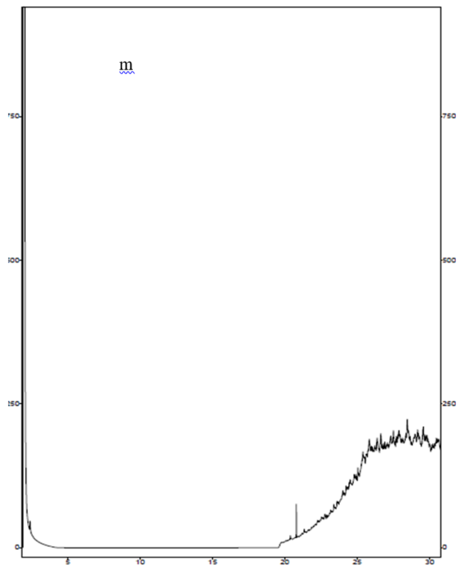
شکل ۱۵ a) کروماتوگرام g100 مربوط به نمونه گازوئیل استاندارد، b) کروماتوگرام Wg مربوط به نمونه قبل از تاثیر باکتری و c) کروماتوگرام g مربوط به نمونه بعد از تاثیر باکتری



(a)



(b)



(c)

شکل ۱٦ a) کروماتوگرام m100 مربوط به نمونه روغن موتور استاندارد، b) کروماتوگرام Wm مربوط به نمونه قبل از تاثیر باکتری و c) کروماتوگرام m مربوط به نمونه بعد از تاثیر باکتری

در بررسی نتایج، دریافت خروجی پیک‌های کاهش یافته، یکی از مهمترین تفسیرهای کروموتوگرام‌ها و مقایسه آن‌ها در شرایط مختلف خاک و آلاینده است. بدین معنا که با افزودن باکتری و تاثیرگذاری آن، در چه بازه‌های زمانی از فعالیت باکتری، سطح زیر نمودار کروماتوگرافی کاهش و در واقع فرآیند تجزیه انجام شده است.

جدول ۹ مقایسه تغییرات سطوح پیک کروماتوگرام‌های گازوئیلی Wg و g و روغن موتوری Wm و m

تغییرات گازوئیل		تغییرات روغن موتور	
زمان بازداری	تغییرات سطح زیر پیک	زمان بازداری	تغییرات سطح زیر پیک
۲/۳۵	افزایش	۱۳/۱	کاهش
۱٤/۸	کاهش	۲۱/۲	کاهش
۱۷/۵۵	حذف	۲۳/۱	افزایش
۱۸/۸٦	حذف	۲٤/۸	افزایش
۲۱/۷	کاهش	۲۵/۷	افزایش
۲۲/۱	افزایش	۲٦/۳	کاهش
۲۳	کاهش	۲٦/۵	کاهش
۲۳/۰۷	کاهش	۲٦/۸	کاهش
۲۵/۷	کاهش	۲۷/۲	کاهش
۲٦/٤	حذف	۲۷/٤	کاهش
۲٦/۵	افزایش	۲۸/۸	کاهش
۲٦/۷	افزایش	۲۹/۰۸	کاهش
۲۷/٤	حذف	۲۹/۱	کاهش
۲۸	کاهش	۳۰	کاهش
۲۸/۲	حذف	۳۰/۱	افزایش
۲۸/۵	کاهش	۳۰/٦٤	کاهش
۲۸/۷	حذف	۳۰/۸	افزایش
۲۹/۹	کاهش	–	–
۳۰/۹	کاهش	–	–

جدول (۹)، نشانی از میزان تاثیر گذاری فرآیند بهپالایی در تزریق یه گونه باکتریایی با عنوان اسپورساسینا پاستوری است. قطعا استفاده از نتایج حاصل از مقایسه کروماتوگرافها و همچنین نمودارهای شکل های پیک های FT-IR همگی باهم تاثیر توامان فرآیندهای بهپالایی و بهسازی را نشان میدهد. نتیجه ای که در پژوهشهای قبل، به صورت همزمان بررسی نشده بود. با این حالی که فرآیند های بهپالایی و تجزیه به مواد هیدروکربنی ساده تر در بهپالایی های تخصصی فیزیکی، شیمیایی و زیستی تا ۹۵٪ فرآیند تجزیه را امکان‌پذیر می‌کنند [37,39]، با توجه به سطوح کاهش پیدا کرده در پژوهش حاضر، میزان بهپالایی حدود ٦۰٪ برای گازوئیل و ۵۰٪ برای روغن موتور بوده است. لازم به ذکر است، این میزان از بهپالایی شاید به تنهایی تاصیر کافی بر تجزیه و ساده سازی اصل هیدروکربن تزریقی به خاک را نداشته باشد، اما با در نظر گرفتن آثار بهسازی آن، میتوان به اهمیت این روش اشاره کرد.

نتیجه گیری

از آنجایی که همواره در مورد بهسازی های زیستی، چالش مربوط به هزینه و مقایسه آن با سایر روش های شیمیایی یا فیزیکی بهسازی مطرح بود، طبق نتایج بدست آمده از پژوهش فوق، می‌توان دریافت:

۱. فرآیند بهسازی خاک های ماسه ای با روش MICP به عنوان یکی از روش های نوین، بر روی خاک مورد پژوهش کارساز و موثر خواهد بود.
۲. با توجه به کاهش کمی پارامترهای مقاومتی خاک های آلوده هیدروکربنی، نسبت به خاک غیر آلوده، استفاده از روش های MICP مورد ارزیابی قرار گرفت و موفقیت آمیز بود.
۳. بهپالایی خاک های آلوده، یکی از دغدغه های مطرح در ژئوتکنیک زیست محیطی است که با بررسی روش بهسازی MICP و بررسی تاثیرات آن به کمک آنالیز FTIR این روش را میتوان تومان به عنوان بهپالایی و بهسازی در مطرح کرد.
٤. یکی از مهمترین چالش ها، بدست آمدن روشی است که در آن فرآیند زیستی، با بهره وری بالاتری، بتواند بهپالایش و بهسازی را انجام دهد؛ در همین راستا شاید استفاده از کنسرسیوم باکتری ها، یکی از بهترین پیشنهادات باشد که در پژوهشهای بعد بتوان از آن بهره برد.

مراجع

1. Cai, B., Ma, J., Yan, G., Dai, X., Li, M., Guo, S., "Comparison of phytoremediation, bioaugmentation and natural attenuation for remediating saline soil contaminated by heavy crude oil", *Biochemical engineering journal*, 112, pp. 170-177, (2016).
2. Sima, N. A. K., Ebadi, A., Reiahisamani, N., Rasekh, B., "Bio-based remediation of petroleum-contaminated saline soils: Challenges", the current state-of-the-art and future prospects. *Journal of environmental management*, 250, 109476, (2019).
3. Li, X., Wang, X., Wan, L., Zhang, Y., Li, N., Li, D., Zhou, Q., "Enhanced biodegradation of aged petroleum hydrocarbons in soils by glucose addition in microbial fuel cells", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology,* Vol. 91(1), pp. 267-275, (2016).
4. Alexander, M., "Biodegradation and Bioremediation. Academic Press San Diego CA. Biodegradation and bioremediation", Elsevier Puclication, Academic Press, San Diego CA, (1999).
5. Rittmann, B. E., McCarty, P. L., "Environmental Biotechnology: Principles and Applications", Tata McGraw-Hill Education, (2012).
6. Khan, A. G., "Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation", *Journal of trace Elements in Medicine and Biology*, Vol. 18(4), pp. 355-364, (2005).
7. Hu, G., Li, J., Zeng, G., "Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: a review", *Journal of hazardous materials,* Vol. 261, pp. 470-490, (2013).
8. Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., "A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria", *Applied biochemistry and biotechnology,* Vol. 176(3), pp. 670-699, (2015).
9. Ladygina, N., Dedyukhina, E. G., Vainshtein, M. B., "A review on microbial synthesis of hydrocarbons", *Process Biochemistry,* Vol. 41(5), pp. 1001-1014, (2006).
10. Nasr, A. M., "Uplift behavior of vertical piles embedded in oil-contaminated sand", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering,* Vol. 139(1), pp. 162-174, (2012).
11. Huang, Y., Wang, L., "Experimental studies on nanomaterials for soil improvement: a review", *Environmental Earth Sciences,* Vol. 75(6), pp. 497, (2016).
12. Tabarsa, A., Latifi, N., Meehan, C. L., Manahiloh, K. N., "Laboratory investigation and field evaluation of loess improvement using nanoclay–A sustainable material for construction", *Construction and Building Materials,* Vol. 158, pp. 454-463, (2018).
13. DeJong, J. T., Fritzges, M. B., Nüsslein, K., "Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering,* Vol. 132(11), pp. 1381-1392, (2006).

14. Whiffin, V. S., van Paassen, L. A., Harkes, M. P., "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique", *Geomicrobiology Journal,* Vol. 24(5), pp. 417-423, (2007).
15. Dejong, J. T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., Van Paassen, L. A., Al Qabany, A., Chen, C. Y., "Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress", *opportunities and challenges. Geotechnique,* Vol. 63, pp. 287-301, (2013).
16. Kogbara, R. B., "A review of the mechanical and leaching performance of stabilized/solidified contaminated soils", *Environmental Reviews,* Vol. 22(1), pp. 66-86, (2013).
17. Akinwumi, I. I., Booth, C., Diwa, D., Mills, P., "Cement stabilisation of crude-oil-contaminated soil", *Proceedings of the ICE-Geotechnical Engineering,* Vol. 169(4), pp. 336-345, (2016).
18. George, S., Aswathy, E. A., Sabu, B., Krishnaprabha, N. P., George, M., "Stabilization of Diesel Oil Contaminated Soil Using Fly Ash", *International Journal of Civil and Structural Engineering Research,* Vol. 2(2), pp.118-123, (2015).
19. Nasr, A. M., "Utilisation of oil-contaminated sand stabilised with cement kiln dust in the construction of rural roads", *International Journal of Pavement Engineering,* Vol. 15(10), pp. 889-905, (2014).
20. Ghasemzadeh, H., Tabaiyan, M., "The Effect of Diesel Fuel Pollution on the Efficiency of Soil Stabilization Method", *Geotechnical and Geological Engineering,* Vol. 35(1), pp. 475-484, (2017).
21. Ghobadi, M. H., Abdilor, Y., Babazadeh, R., "Stabilization of clay soils using lime and effect of pH variations on shear strength parameters" *Bulletin of Engineering Geology and the Environment,* Vol. 73(2), pp. 611-619, (2014).
22. Estabragh, A. R., Kholoosi, M., Ghaziani, F., Javadi, A. A., "Mechanical and Leaching Behavior of a Stabilized and Solidified Anthracene-Contaminated Soil", *Journal of Environmental Engineering,* Vol. 144(2), pp. 04017098, (2017).
23. Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., Bang, S. S., "Microbiological precipitation of $CaCO_3$", *Soil Biology and Biochemistry,* Vol. 31(11), pp. 1563-1571, (1999).
24. Ramakrishnan, V., Ramesh, K. P., & Bang, S. S., "Bacterial concrete", In Smart Materials, Vol. 4234, pp. 168-176, International Society for Optics and Photonics, April, (2001).
25. DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., Nelson, D. C., "Bio-mediated soil improvement", *Ecological Engineering,* Vol. 36(2), pp. 197-210, (2010).
26. Ferris, F. G., Stehmeier, L. G., Kantzas, A., Mourits, F. M., "Bacteriogenic mineral plugging", *Journal of Canadian Petroleum Technology,* Vol. 36(09), (1997).
27. Mortensen, B. M., Haber, M. J., DeJong, J. T., Caslake, L. F., Nelson, D. C., "Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation", *Journal of applied microbiology,* Vol. 111(2), pp. 338-349, (2011).
28. Abduolrahimi, S., Ghorbanzadeh, N., Forghani, A., Farhangi, M. B., "Bioremediation of cadmium in

contaminated sandy soil by microbially induced calcite precipitation", *Journal of Water and Soil*, Vol. 32(2), pp.343-357, (2018).

29. Kang, C. H., Han, S. H., Shin, Y., Oh, S. J., So, J. S., "Bioremediation of Cd by Microbially Induced Calcite Precipitation", *Applied Biochemistry and Biotechnology,* Vol. 172(4), pp. 1929-1937, (2014).
30. Cheng, L., Shahin, M. A., "Stabilisation of oil-contaminated soils using microbially induced calcite crystals by bacterial flocs", *Géotechnique Letters*, Vol. 7(2), pp. 146-151, (2017).
31. Cheng, L., Cord-Ruwisch, R., "In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation", *Ecological Engineering*, Vol. 42, pp. 64-72, (2012).

۳۲. بلوری بزاز، محمدتقی، بلوری بزاز، جعفر و کرابی، سید محسن، "مقایسه‌ی تاثیر نوع محیط کشت باکتری Sporosarcina Pasteurii بر میزان و نوع رسوبات کربنات کلسیم در جهت بهسازی خاک‌های دانه‌ای"، نشریه مهندسی عمران امیرکبیر، دوره ۵۳، شماره ۷، صفحه ۱۸، (۱٤۰۰).

32. Bolouri-Bazaz, M. T., Bolouri-Bazaz, J., "Effect of Hydrocarbon Contamination on Biostabilization of Soil Contaminated with Motor Oil and Gasoline", *Geomicrobiology Journal*, 38(6), pp. 467-481, (2021).
33. Bauer, A. W., "Kirby, MM, Sherris, JC and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standard method", *American Journal of Clinical Pathology*, Vol. 45, pp. 493-496, (1966).
34. Adeniji, A. O., Okoh, O. O., Okoh, A. I., "Analytical methods for the determination of the distribution of total petroleum hydrocarbons in the water and sediment of aquatic systems: A review", *Journal of Chemistry*, (2017).
35. Enviromental Protection Agency (EPA) of United State, "Treatment technologies for site cleanup: Annual Status Report", Office of Solid Waste and Emergency Response. 10th Ed., USA, (2001).
36. Lai, C. C., Huang, Y. C., Wei, Y. H., Chang, J. S., "Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil", *Journal of hazardous materials*, Vol. 167(1-3), pp. 609-614, (2009).
37. Vasudevan, N., Rajaram, P., "Bioremediation of oil sludge-contaminated soil", *Environment International*, Vol. 26(5-6), pp. 409-411, (2001).
38. Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., Wu, Y., "Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review", *Current microbiology*, Vol. 71(2), pp. 220-228, (2015).
39. Luo, Q., Hou, D., Jiang, D., & Chen, W., "Bioremediation of marine oil spills by immobilized oil-degrading bacteria and nutrition emulsion", *Biodegradation Journal, (Springer)*, Vol. 32, pp. 165-177, (2021).